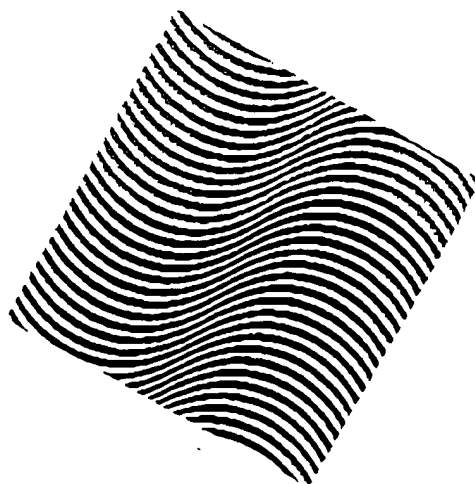




EXHIBIT I

近赤外 分光法入門

岩元 睦夫・河野 澄夫・角住 純



幸書房

3.4 近赤外スペクトル

3.4.1 スペクトルの測定

市販の近赤外装置では、近赤外域に特異的な吸収がなく、長期間安定したセラミック板が標準板(物)として用いられる場合が多い。装置により測定

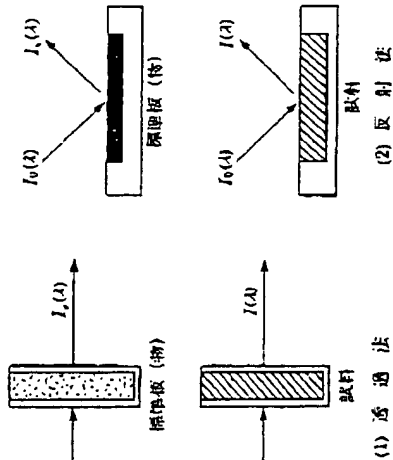


図3.5 吸収度の測定

手順は多少異なるが、図3.5のように、まず波長 λ における標準板の反射光の強さ $I_r(\lambda)$ (あるいは透過光の強さ)が測定され、次いで試料の反射光の強さ $I_r(\lambda)$ (あるいは透過光の強さ)が測定され、次式により見掛けの吸収度 $A(\lambda)$ が算出される。

$$A(\lambda) = \log \{ I_0(\lambda) / I_t(\lambda) \} \quad (3.15)$$

入射光の強さを $I_0(\lambda)$ とすると、(3.15)式は

$$A(\lambda) = \log \{ I_0(\lambda) / I_0(\lambda) \cdot I_r(\lambda) / I_t(\lambda) \} \quad (3.16)$$

いま、 $I_0(\lambda) / I_0(\lambda) = R_s^*(\lambda)$ (または $T_s^*(\lambda)$)、 $I_r(\lambda) / I_t(\lambda) = R^*(\lambda)$ (または $T^*(\lambda)$)であるから、(3.16)式は

$$\begin{aligned} A(\lambda) &= \log \{ 1 / R^*(\lambda) \} - \log \{ 1 / R_s^*(\lambda) \} \\ &= \log \{ 1 / T^*(\lambda) \} - \log \{ 1 / T_s^*(\lambda) \} \end{aligned} \quad (3.17)$$

または

となる。ここで、 $R^*(\lambda)$ は試料の絶対反射率、 $R_s^*(\lambda)$ は標準板の絶対反射率(または、 $T^*(\lambda)$ は試料の絶対透過率、 $T_s^*(\lambda)$ は標準板の絶対透過率)であ

る。試料の「見掛けの吸収度」は、試料の「真の吸収度」から標準板の「真の吸収度」を引いた値となる。したがって、同一試料であっても、図3.6のように、標準板が異なると近赤外スペクトルは上下にシフトする。一連の実験においては、同じ標準板を用いることが基本となる。

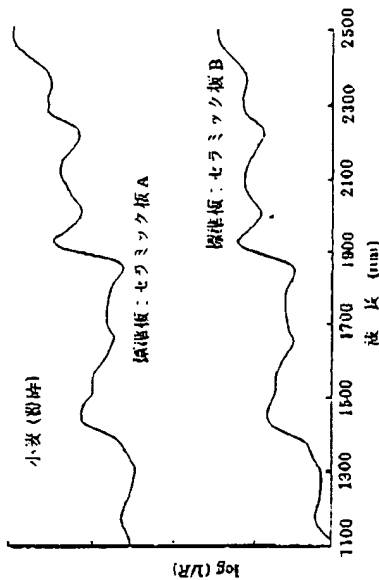


図3.6 近赤外スペクトルに及ぼす標準板の影響

3.4.2 スペクトルに及ぼす要因

(1) 粒度

光散乱スペクトルの測定においては、粉体試料の平均粒径や粒度分布、試料セルへの充填密度など試料の物理的特性が精度に影響する^{3,4)}。小麦のような穀類においては、同一条件下で粉碎した試料でも、試料の品質、形状などによって粒径が影響を受ける。一般に、タンパク質の多い穀類は粒径が硬く、タンパク質の少ない試料に比べ粒径が粗くなり、 $\log(1/R)$ 値は大きくなる(図3.7)。粒度の違いによるスペクトルの変動では、スペクトルのシフト量が図3.7に示すように長い波長域において大きいのが特徴である。

キャリブレーションにおいて、粒度の影響を除去する方法として、①重回帰分析の説明変数に中立(成分による吸収のない)波長における $\log(1/R)$ 値を加える、②Kubelka-Munk関数への変換を行う、③スペクトルを微分する、④正規化を行う、などのデータ処理方法が研究されてきた。平均粒径に150~335 μm の幅を持つ粉碎小麦のタンパク質の分析において、2次微分ス

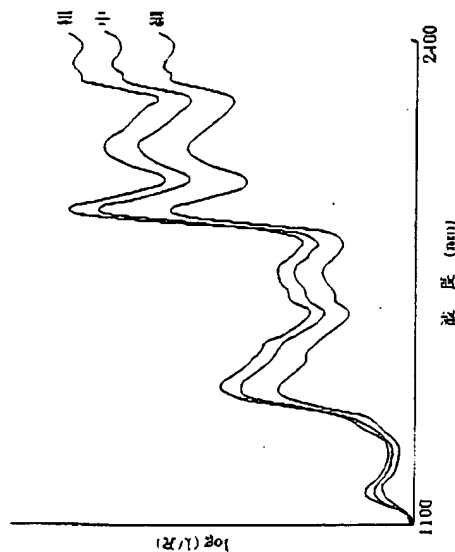


図 3.7 粒度の異なる小麦粉のスペクトル

ベクトルを正規化した $d[\log(1/R)]/d[\log(1/R)]$ の形式の検量線が高い測定精度を示した。

(2) 温度

近赤外法の精度には温度が影響する。温度は水の O-H の吸収に影響を及ぼす。温度が上昇すると、水のスペクトルは短波長側にシフトする。2 次微分スペクトルによる観察の結果、温度上昇により、水素結合と無関係な自由な水分子種に相当すると考えられる吸収の強度が増加する¹⁾。

Williams ら²⁾ は、小麦のタンパク質および水分の近赤外法による測定精度に及ぼす試料温度の影響を、-10～45°C の範囲で、市販の近赤外装置 3 機種を用いて検討した。室温 (22°C) で作成した検量線に基づきタンパク質を測定した結果、5°C 当り 0.1% の割合で、高温になるほどタンパク質の値は低く測定された。しかし、水分に対する試料温度の影響はタンパク質の場合ほど大きくなかった。

(3) 試料色

大豆を使った実験で、種子色はタンパク質の測定精度に影響しないこと³⁾、およびビール中のアルコール分析における波長選択に対しビールの色は影響しないこと⁴⁾が報告されている。しかし、クロロフィル、カロテノイドなど、

食品中の色素も近赤外域で固有の吸収を持つために、検量線作成用試料と異なる色彩の試料に適用することには問題がある。

油脂などの酸化、変性による褐変、変色した試料についても注意を払う必要がある。

この他、試料の色彩による影響が見られる場合は、小麦のように、品種間の力学的特性の差から生ずる粉砕試料の不均一性に起因することがある。

(4) その他

未知試料の成分値の 1 つが、検量線を作成するときに用いた試料の成分値の範囲から逸脱する場合、分析値に大きな誤差が発生することがある。特に水分の影響が大きい。これは、水が強い吸収を持つとともに、試料の光散乱に対して影響するためで、測定中に試料が吸湿しないよう注意を要する¹⁰⁾。

3.4.3 近赤外スペクトル

図 3.8 は大豆および米、ならびにそれぞれの主要成分である水、タンパク質、脂質、デンプンの近赤外スペクトルである。構成成分の吸収バンドは、成分特有の官能基に基づくもので、米および大豆のスペクトルにおいても、内容成分に基づく吸収バンドが見られる。大豆、米のいずれの試料でも観察される 1935 nm の吸収バンドは主に水に基づくものである。米のスペクトル

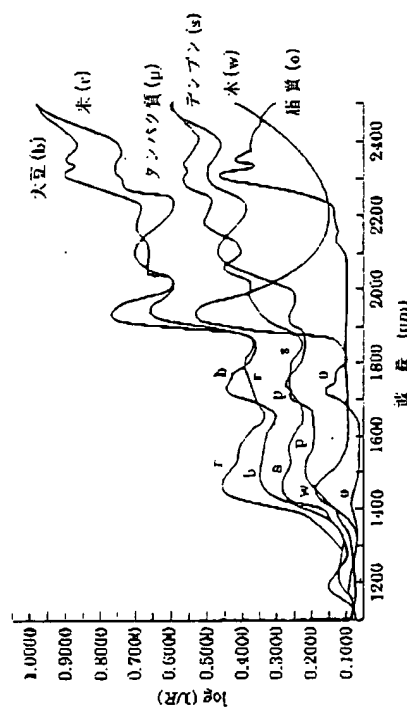


図 3.8 大豆および米ならびに主要成分の近赤外スペクトル

の2100 nmに見られる吸収バンドは主にデンプンに基づくもので、デンプン含量の少ない大豆ではこの吸収バンドは顕著でない。2180 nmに見られるタンパク質の吸収バンド、並びに2305 nmおよび2345 nmに見られる脂質の吸収バンドは、タンパク質、脂肪含量の多い大豆においてはつきりと見ることができ、

以上のように近赤外スペクトルには複数の成分の情報が含まれており、近赤外法においては、これらのスペクトルから重回帰分析などの統計的手法を用いていろいろな情報が抽出、解析される。

3.5 定量分析の場合の解析例 (重回帰分析)

3.5.1 キャリブレーション¹⁾

近赤外法でタンパク質などの成分を定量分析するためには、スペクトルデータから成分値を算出する検量線 (calibration equation) を、あらかじめ作成しなければならぬ。すなわち、対象とする成分値が従来法によって精度よく分析された試料 (以後、検量線作成用試料 (calibration set) という) を用い、スペクトルと成分値との関係を数学的に説明することが必要となる。この作業のことを、キャリブレーション (calibration) という。

キャリブレーションにおいて、対象とする成分値は、次のような数式で重回帰される。

$$\begin{aligned} c &= K_0 + K_1 L(\lambda_1) + K_2 L(\lambda_2) + K_3 L(\lambda_3) + \dots \\ &= K_0 + K_1 \frac{L(\lambda_1)}{L(\lambda_0)} + K_2 \frac{L(\lambda_2)}{L(\lambda_0)} + \dots \end{aligned} \quad (3.18)$$

または

ここで、 c は対象とする成分の予測値 (近赤外法による測定値)、 $L(\lambda_i)$ は波長 λ_i における吸光度、吸光度の1次微分値、あるいは吸光度の2次微分値などである。キャリブレーション時の重回帰分析の目的は、測定誤差(残差)

注) 本書では、定量分析の場合は「検量線の作成」、定性分析および機器を校正する操作の場合は「キャリブレーション」とした。

3.5 定量分析の場合の解析例 (重回帰分析)

が最小になるように、(3.18)式における採用波長 λ_i の組合せと、比例定数 K_i を決定することにはかならない。比例定数 K_i は、スペクトルデータを説明変数、対象成分の濃度を目的変数として決定される。

通常、重回帰式は説明変数が p 個の場合、次式で示される。

$$\hat{y}_i = a_0 + a_1 x_{i1} + a_2 x_{i2} + \dots + a_p x_{ip} \quad (3.19)$$

ここで、 \hat{y}_i は回帰予測値である。対象とする成分の分析値 (観測値) と回帰予測値との残差を最小にする条件で a_0, a_1, \dots, a_p の係数が決定される。計算方法の詳細な説明については専門書¹⁾に委ねることにする。

重回帰分析の変数を選択する方法には、全可能回帰法、変数増加法、変数減少法、変数増減法、および変数減増法がある。

全可能回帰法は説明変数 (例えば、約700波長点における $\log(1/R)$ の値、 $d \log(1/R)$ の値、あるいは $d^2 \log(1/R)$ の値) のあらゆる組合せについて重回帰を行う方法である。計算の繰り返し回数が多くなることが欠点で、例えば700波長から2波長を選択する場合、 $700C_2 = 241650$ 回、3波長を選択する場合、 $700C_3 = 56921900$ 回にも達する。したがって、この方法により計算する場合、計算時間を節約するために、対象とする測定波長点および説明変数の数が制限される。

変数増加法は説明変数を1つずつ増やしていく方法である。最初に目的変数と単相関係数が最大ものを第1番目の説明変数 x_1 とし、次に x_1 以外の説明変数 x_2 と x_1 との2変数を用いて重相関係数の最大になる x_2 を選びこれを x_2 とする。以下、同様な方法により変数を加えていく方法である。700波長から3波長を選択する場合の計算の繰り返し回数は、 $700 + 699 + 698 = 2097$ 回となり、全可能回帰法に比較してかなり少ない。しかしながら、この方法では最良の重回帰式に到達できないという保証がない。

変数減少法は考察の対象となる p 個の説明変数をまず全部含めて重回帰式を作り、それから各段階で最も重要でないと思われる変数を1つずつ減らす方法である。この方法も変数増加法と同様、最良の重回帰式が得られるとは限らない。

変数増減法は変数増加法と変数減少法を組合せた方法である。本質的には増加法であるが、変数を追加した各段階で除去すべき変数がないかどうかを

チェックしながら変数を増加していく方法である。

変数減増法は変数減少法と変数増加法を組合せたもので、変数を減らす各段階でいったん削除した変数の中に再採用する変数がないかどうかを検討する方法である。

市販の近赤外装置の計算ソフトには、計算を効率よく、またよりよい重回帰式が得られるような工夫がいろいろと施されている。

以上のような方法により求められた検量線の回帰の精度は、重相関係数 R (multiple correlation coefficient) の2乗である寄与率 R^2 および残差標準偏差 σ (standard deviation of residuals) の2乗によって表される。寄与率 R^2 および残差標準偏差 σ は次式で示される。

$$R^2 = \frac{\sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} \quad (3.20)$$

$$\sigma = \sqrt{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2 / (n - p - 1)} \quad (3.21)$$

近赤外法において、 σ は検量線作成時の標準誤差 (以後、検量線標準誤差 (standard error of calibration, SEC) という) である。検量線標準誤差を standard error of estimate (SEE) という場合もある。説明変数が増加するにつれて、重相関係数は大きくなり、検量線標準誤差は小さくなる。

3.5.2 検量線の評価

通常、キャリブレーションの過程では、複数の重回帰式が作成される。作成された重回帰式には、説明変数と目的変数の間に普遍的な関係がなく偶然にできた式も含まれる。また、説明変数の数を増やして検量線作成用試料にのみ適合し、一般性を失った式も存在する。測定精度が高く安定した式と、そうでない式を識別するため、検量線作成用試料以外の試料で検量線作成用試料と成分分布の類似した試料 (以後、評価用試料 (prediction set) という) を用いて、作成された重回帰式の測定精度が評価される。この作業のことをバリデーション (validation) あるいはプレディクション (prediction) という。

重回帰式の未知試料に対する測定精度は、近赤外法による予測値と従来法による分析値との残差の標準偏差や平均値によって評価される。この残差の

標準誤差を SEP (standard error of prediction, 予測標準誤差)、平均値をバイアス (bias) という。SEP およびバイアスは次式で求められる。

$$SEP = s_{y_i} = \sqrt{\sum (d_i - \bar{d})^2 / (n - 1)} \quad (3.22)$$

$$\text{バイアス} = \bar{d} = \frac{1}{n} \sum d_i \quad (3.23)$$

ここで、 d_i は近赤外法による予測値と従来法による分析値との差、 \bar{d} は d_i の平均値、および n は評価用試料の数である。

SEC の値は、重回帰式の説明変数が増加するにつれて減少する傾向を示すが、SEP は図 3.9 に示すように、下向きに凸の値を示す。すなわち、SEP の値は説明変数の増加につれて減少するが、途中から逆に増加する。この現象をオーバーフィッティング (overfitting, 過剰適合) という。これは、重回帰式に説明変数を取り込み過ぎて、重回帰式が検量線作成用試料のみに適合し、

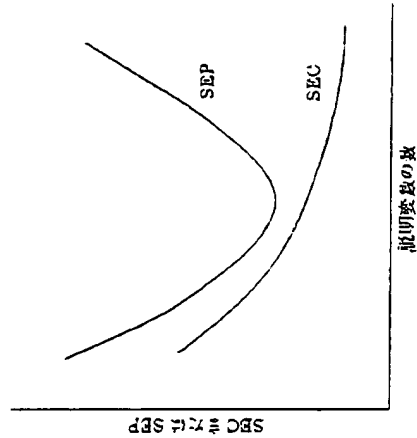


図 3.9 説明変数の数と SEC および SEP の関係

注) 予測標準誤差のことを SDPD (standard deviation of validation differences), SDP (standard deviation of prediction), SED (standard error of differences) ということもあり、表現に混乱が見られる。また、(3.22) 式の \bar{d} を 0 と見なした式で算出した値を SEP と呼ぶこともある。したがって、関係の文脈を見る場合、本文でどのように定義されているかに注意を要する。定義を明確にするため、(3.22) 式を SEPDC (bias-corrected standard error of prediction), M(CSEP (mean-corrected standard of prediction) と呼ぶこともある。

他の試料には適合しなくなってしまうことを意味する。したがって、検量線の作成においては、このオーバーフィッティングの現象が発生しない範囲に説明変数の数を抑えなければならぬ。

近赤外法による予測値と従来法による分析値が完全に一致すれば、両者の相関図は原点を通り、軸に対して45°の直線となる。もし、相関図が45°の直線に対してある角度で傾いた直線になり、その傾きが1に比べて有意でであれば、その回帰式には「スキュー (skew)」があるという (図 3.10 (a))。回帰式にスキューがあるかどうかは、次式の t 検定により調べられる。

$$t = \frac{1-b}{s_e/\sqrt{S_{xx}}} \quad (3.24)$$

ここで、 b は回帰式の傾き、 s_e は回帰式の残差標準偏差、 S_{xx} は x の平方和である。 s_e および S_{xx} は次式で定義される。

$$s_e = \sqrt{(\sum(y_i - \bar{y})^2 - b^2 \sum(x_i - \bar{x})^2) / (n-2)} \quad (3.25)$$

$$S_{xx} = \sum(x_i - \bar{x})^2 \quad (3.26)$$

ここで、 y_i は従来法による分析値、 x_i は近赤外法による予測値である。

t の値が $t(n-2, 0.05)$ の値より大きい場合は有意であり、回帰式にはスキューがあると判断される。相関図にスキューがある重回帰式は検量線として適当でない。作成した重回帰式の中で、他に適した重回帰式がない場合は、検量線の作成作業を再度行う必要がある。

もし、近赤外法による予測値と従来法による分析値の相関図が、原点を通り軸に対して45°の直線と平行にずれ (図 3.10 (b))、近赤外法による予測値と

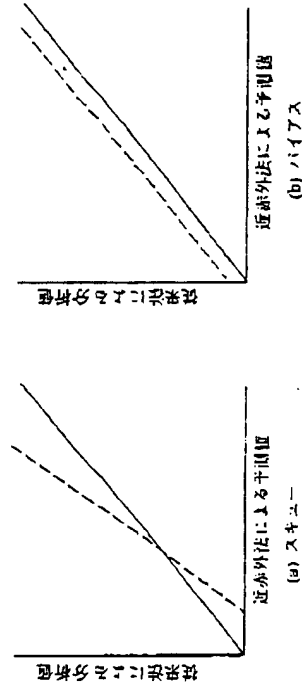


図 3.10 近赤外法による予測値と従来法による分析値の関係

従来法による分析値との間に有意な差が観察されるならば、この回帰式にはバイアスがあるという。回帰式にバイアスがあるかどうかは、次式の t 検定により調べられる。

$$t = \frac{\bar{d}}{s_d/\sqrt{n}} \quad (3.27)$$

ここで、 s_d および \bar{d} は (3.22) 式および (3.23) 式で定義される値である。

t の値が $t(n-1, 0.05)$ の値より大きい場合は有意であり、回帰式にはバイアスがあると判断される。スキューの場合と同様、相関図においてバイアスがある重回帰式は検量線として適当でない。作成した重回帰式の中で、他に適した重回帰式がない場合は、検量線の作成作業を再度行う必要がある。

SEP の値が小さく、スキューやバイアスがない重回帰式がルーチン分析用の検量線として選択される。

3.5.3 ルーチン分析

近赤外法の食品への応用は、穀物、畜製品、加工食品、飲料、青果物など様々な分野で行われている。これらの研究成果をルーチン分析にまで波及させるためには、いくつか解決しなければならない点がある。

ここで、小麦のタンパク質を測定する場合について、検討すべき事項を整理してみよう。

まず、実用的な検量線を作成する段階において、次の事項について事前に検討しなければならない。

(1) 検量線作成用試料および評価用試料の収集方法 (品種、産地、収穫時期、年次など) ……将来分析するであろう対象品目の母集団を代表する標本でなければならぬ。何かに偏った試料を用いると、開発した検量線が将来の対象品目と適合しない場合が発生し、測定誤差が大きくなる。

(2) 粉砕機の機種および粉砕条件 ……粉砕機が異なると、粉砕試料の粒度および粒度分布が大きく異なる。また、同一機種においても、粉砕条件、例えばウォーミングアップ時間、試料の投入量などが異なると、粉砕試料の粒度分布が異なる。平均粒度および粒度分布の変動は、スペクトルの変動に

直接影響し、結果として測定誤差が大きくなる。したがって、粉砕機および粉砕条件は同一にする必要がある。

(3) 粉砕試料の測定までの保管条件……粉砕によって試料の温度が多少上昇する。品温の変動は測定誤差を大きくする原因になるため、スペクトル測定前に品温を整える必要がある。通常、水分が蒸発しないような密閉容器に粉砕試料を入れ、恒温槽などにより品温が整えられる。

(4) 近赤外装置の機種……検量線の異機種間の移設は、一部の機種を除き、基本的にはできない。したがって、将来の使用形態を考慮して近赤外装置を選定することが重要である。機種を変える場合は検量線を作り直す必要がある。

(5) 試料セルへの試料の詰め方および試料セルの装置へのセットの仕方……粉砕試料の場合、試料の充填の仕方によって光の散乱状態が異なる。市販の粉体試料用セルは充填した試料を一定荷重で押さえるような工夫が施されているが、試料を充填する際、試料を押さえながら詰める場合と、そうでない場合では充填密度が異なり、その結果スペクトルが変動する。また、試料セルを装置へセットする時の試料セルの向きもスペクトルに影響する場合があるため注意を要する。

(6) 環境条件 (温度、湿度など) ……ルーチン分析時の環境温度・湿度などは検量線を作成した時のそれと同じでなければならぬ。スペクトルに及ぼす要因 (3.4.2項) のところで述べたように、品温が変動すると近赤外法による予測値も変動する。また、水分含量がキャリブレーション時のレンジと大きく異なる場合は、測定誤差の発生の原因となる。

以上の事項について標準化を行っても、ルーチン分析において近赤外法の分析値が信頼されるためには、①ユーザーが行う日常的な点検方法は如何にあるべきか、②分析の正確さを確保するための検定方法は如何にあるべきかなど、運営方法について工夫が必要である。特に公定法として用いる場合には、公的機関による正確さの定期的な検定が不可欠である。

米国においては、近赤外法は既に小麦のタンパク質の分析に公定法として用いられており、その詳細は米固農務省連邦穀物検査局 (Federal Grain Inspection Service) が出した『穀物検査ハンドブック-Book V, 小麦タン

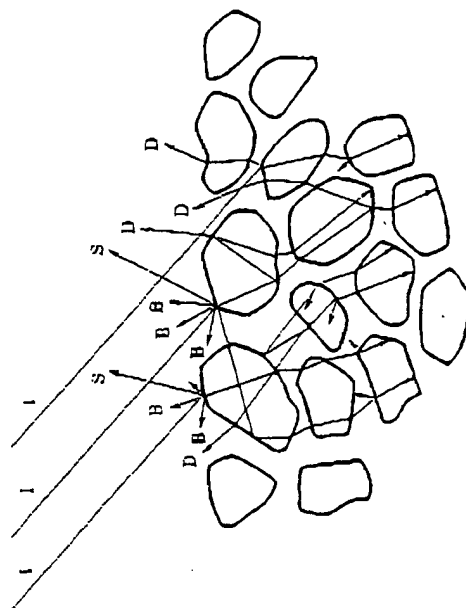
パク質』に述べられている。このハンドブックによれば、近赤外法を信頼ある公的な測定法として維持するために「品質管理局 (QCB, Quality Control Branch)」が設けられており、個々の近赤外装置およびその従事者は同局の監視下に置かれている。

引 用 文 献

- 1) I. Murray, International NIR/NIT Conference, Budapest, Hungary (1986), p. 13.
- 2) B.G. Osborne, T. Fearn, "Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis", Longman Scientific & Technical, UK (1986)
- 3) P.C. Williams, B.N. Thompson, *Cereal Chem.*, 55, 1014 (1978)
- 4) K.H. Norris, P.C. Williams, *ibid.*, 61, 158 (1984)
- 5) P.C. Williams, K.H. Norris, C.W. Gehrke, K. Bernstein, *Cereal Food World*, 28, 149 (1983)
- 6) M. Iwamoto, J. Uozumi, K. Nishinari, International NIR/NIT Conference, Budapest, Hungary (1986), p. 3.
- 7) P.C. Williams, K.H. Norris, W.S. Zarowski, *Cereal Chem.*, 59, 473 (1982)
- 8) 中村茂樹, 日作東北支部報, 21, 67 (1978)
- 9) A.G. Conventry, M.J. Hunston, *Cereal Food World*, 29, 715 (1984)
- 10) P.C. Williams, K.H. Norris, *Cereal Chem.*, 60, 202 (1983)
- 11) 例えば, 応用統計ハンドブック編集委員会編, "応用統計ハンドブック", 筑賢堂 (1978)

(2) 吸光度の非線形性

非破壊測定を主眼とする近赤外法では、試料は光を強く散乱するものが多く、このため、いわゆる拡散反射 (diffuse reflectance) 法による測定が基本となる。拡散反射法の典型的な試料形態である粉体に光を照射した場合、図 4.1 に示すような各種の反射および散乱光が発生する¹⁾。拡散反射法では、理想的には、このうち物質内部での吸収を経た拡散反射光がとらえられ分光される。非散乱性試料の透過光においては、成分濃度と吸光度との間に Lambert-Beer の法則で示される線形関係が存在する。しかし、拡散反射光においては、粉体内部での光の多重散乱現象のためにこれが成立しない。さらに、必要な光成分である後方散乱光と正反射光の混入も、次に述べるように問題を生ずる。



1: 入射光, S: 正反射光, D: 拡散反射光, B: 後方散乱光

図 4.1 粉体層における反射と散乱¹⁾

(3) ベースライン変動と乗算的変動

各試料の散乱特性の違いも測定されるスペクトルに入力する影響を与える。特に、粉体では粒度や充填密度が、また固体では表面状態や内部構造が試料ごとに必然的に異なり、これらが原因で図 4.1 に示す各種の反射・散乱光の強度や方向にバラツキが生じる。その結果、測定されるスペクトルには、試

4 章 データ処理法

4.1 近赤外スペクトルの複雑さとデータ処理の流れ

4.1.1 スペクトルの複雑さ

食品や農産物などを非破壊的に測定すると、その近赤外スペクトルは、中間赤外における従来の「破壊的」分光法のスペクトルに比べて極めて複雑な構造を呈する。また、非破壊的測定では、スペクトル構造の複雑さに加えて、試料の物理化学的性質や測定環境などの諸要因の変化がスペクトルに対し複雑な変動を生じさせる。近赤外スペクトルのこのような複雑さは、以下の項目で述べるようにいくつかの特性に影響を及ぼす諸要因を互いに分離し、複雑なデータ処理は、スペクトルに必要とされる。近赤外法においては、複雑なスペクトルの中から不要な変動を取り除くことによって、必要とする情報を分離抽出するのが目的である。近赤外法の各種のデータ処理法の原理と動作を理解し、その適切な運用を行うためには、スペクトルに影響を及ぼす諸要因をよく把握し、個々の処理法がどの要因に対処するためのものであるかを正しく理解することが大切である。

(1) 多重共線性

一般に、単一化学成分の近赤外スペクトルは、対応する中間赤外域のスペクトルと比較して、幅が広く微弱な多数の吸収ピークの重ね合わせから構成されている (3.4.3 項参照)。さらに、多成分系の試料のスペクトルではそのようなピークが幾重にも重なり合っている。このため、各成分の濃度に関する情報は、それぞれが広い波長範囲に分散する。その結果、各波長においては多くの情報が重畳して含まれていることになる。このことは、スペクトルを構成する波長間に互いに強い相関が存在することを意味する。このような性質を多重共線性 (multicollinearity) と呼ぶ。

料ごとにベースラインが上下するような加算的な変動や、スペクトル全体にわたる乗算的な変動が現れる。粉体の粒度・充填密度および固体の表面状態・内部構造は多くの場合、近赤外スペクトルを変動させる重要な要因（以後、変動要因という）であって、それらの影響を除去することは、近赤外法のデータ処理における主要な課題の1つである²⁾。温度変化などのその他の物理的な要因もスペクトル全体にわたる同様な変動を与えることがある。

(4) その他の変動

近赤外域では吸収ピークが微弱であるためSN比の高い分光装置が用いられるが、微量成分や吸光係数の小さな成分の測定においては、光電変換やその後の電氣的信号処理などによって生じるランダムノイズが測定精度の限界を決める要因となる。また、スペクトルの変動ではないが、試料の目的成分の従来法による分析値の誤差も、近赤外法の性能に影響を与える。

4.1.2 データ処理の流れ

前項で述べた種々の変動要因により複雑に変動する近赤外スペクトルから必要な情報を引き出すには、コンピュータによる一連のデータ処理が不可欠であり、目的に応じてこれまで多様なデータ処理法が提案されてきた^{2,3,4)}。代表的な処理法は市販の近赤外装置に標準ソフトウェアとして搭載されている。比較的新しい処理法などは別売のソフトウェアとして提供されることもある。また、別のベンダーが販売する汎用ソフトウェアパッケージの利用も可能である。

近赤外法を新しい産物の定量分析に適用する場合、①キャリブレーション、②検量線の精度の評価、および③未知試料の測定という、3つのステップを踏むのが普通である（図4.2）。このうち③は日常的に行うルーチン分析であって、その測定精度や信頼性は①と②の段階でのデータ処理の適否に大きく依存する。また、定性分析を行う場合にもこれに準じたステップを踏むことが望ましい。

キャリブレーションを行うには、適当な数の検量線作成用試料が必要である。これらの試料は、目的とする成分や物理的特性（以後、目的特性という）の値を従来法（標準測定法など）を用いて充分な精度で測定する必要がある。

4.1 近赤外スペクトルの処理とデータ処理の流れ

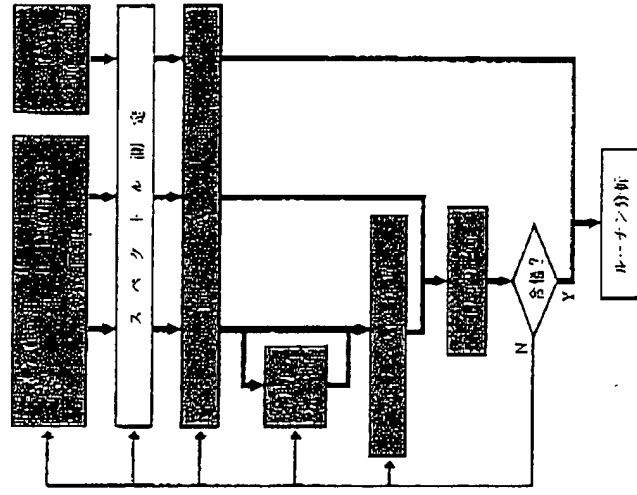


図4.2 データ処理におけるデータの流れ

従来法としては、目的特性に応じて化学的あるいは物理的な測定法が考えられるが、便宜上その測定値を分析値と呼ぶことにする。

検量線作成用試料が用意できたら、まず近赤外スペクトルを測定し、それを目的特性の分析値とともにコンピュータのメモリ（通常はディスク）に記録したのち、一連のデータ処理を施すことになる。以下、このデータ処理の流れをスペクトルに含まれる変動の種類と対応させながら述べる。

(1) スペクトルの前処理

重回帰分析などの統計的手法によるキャリブレーションに先立って、各種の変動要因による不要なスペクトルの変動の低減を目的に、通常いろいろな前処理が行われる。代表的な処理として、Kubelika-Munk変換、平滑化、微分、正規化、乗算的散乱因子(MSF)の除去などがある。また、同様の目的から主成分分析やフーリエ変換などのさらに高度なスペクトル変換が使われ

ること多い。しかし、この2つの手法は主成分回帰分析やフーリエ回帰分析などの呼び名で重回帰分析と一体の処理法とみなされることが多いことから、これらは従来の線形重回帰分析やPLS回帰分析とともに4.3.2項に含めて述べることにする。

(2) キャリブレーション

キャリブレーションは、スペクトルデータと目的特性の分析値との間の数学的関係式、すなわちモデルを構築する処理であって、データ処理の核となる操作である。モデルの作成は、前処理を終えた検量線作成用試料のスペクトルデータおよび分析値を用い、統計的手法によって行われる。近赤外法が対象とする目的特性は非常に多様であり、それぞれの目的特性に適した手法が選択される。代表的な方法として、線形重回帰分析、PLS回帰分析、主成分回帰分析、判別分析などがある。キャリブレーションのための各種データ処理は、基本的にはスペクトルの多重共線性に対処する処理であるが、同時に、ベースライン変動やランダムノイズの影響の除去に対しても一定の効果がある。

(3) 補助的解析法

各種の前処理からキャリブレーションに至る一連の処理を支援することを目的に、補助的に用いられる解析法がある。これは、試料やスペクトルの特性や構造などに関する情報を引き出し、前処理やキャリブレーションの各段階におけるパラメータの選択・決定に際しての判断材料を提供するための手法であり、後述する成分スペクトル再構成法、対応分析、試料の選択などがこの範囲に含まれる。

(4) 検量線の精度の評価

作成された検量線の未知試料に対する予測の精度を正しく評価するため、検量線作成用試料とは別の検量線評価用試料を用いて、未知試料に対する測定誤差が求められる。検量線の性能が充分ではないと判定された場合には、必要に応じて処理法の種類やパラメータの変更などを行い、検量線の修正を行う。なお、検量線の精度の評価を検量線作成用試料だけに基づいて行う方法もある。

(5) ルーチン分析

精度の評価を無事パスした検量線は、未知試料のルーチン分析に際し、スペクトルデータから目的特性の値を予測する関係式として使用される。試料の諸特性の時間的変化、試料の産地や品種の変更、装置の特性変化などが生じた場合には、検量線の不適合が発生する可能性があるため、その定期的なメンテナンスが大切である。

4.2 スペクトルの前処理

4.2.1 スペクトルの物理量の選択

ほとんどの近赤外装置は、3.3節で述べたようにスペクトルの物理量として見掛けの吸光度（以後、吸光度という）

$$A(\lambda) = \log[1/R(\lambda)] \quad (4.1)$$

を出力する。ここで、 $R(\lambda)$ は波長 λ における見掛けの反射率である。しかし、4.1.1項で触れたように、拡散反射法においては吸光度の線形性が成立せず、吸光度を定量分析に用いることには問題があるように思われる。

ところで、拡散反射光と物質の吸光係数との関係を定量的に表現したものとして、Kubelka-Munkの式

$$K(\lambda)/S(\lambda) = \frac{(1-R(\lambda))^2}{2R(\lambda)} \quad (4.2)$$

が知られている⁹⁾。ここで、 $K(\lambda)$ と $S(\lambda)$ は、それぞれ散乱物質の吸収係数と散乱係数である。この式から、吸収係数と散乱係数の比と吸光度との関係式として

$$K(\lambda)/S(\lambda) = \cosh A(\lambda) - 1 \quad (4.3)$$

が導かれる⁹⁾。したがって、図4.3に示すように、両者の関係は明らかに非線形である。特に、目的特性が広い範囲の値を取る場合は、非線形性を無視することができないため、(4.2)式の右辺のKubelka-Munk関数を用いて線形化を行うことがある。しかしながら、吸収係数の変動範囲が比較的狭く、かつ散乱係数を定数とみなすことができる場合には、吸光度に対する吸収係数の変化をほぼ線形に近似することができる。近赤外法の応用の多くは、目的

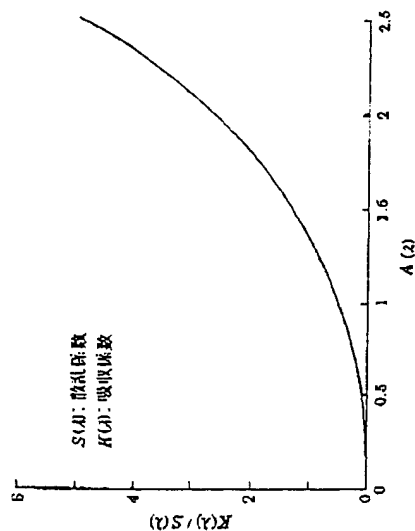


図 4.3 Kubelka-Munk の式から導出される $A(\lambda)$ と $K(\lambda)/S(\lambda)$ の関係

特性の変動範囲が比較的狭く、この条件にほぼ合致しており、吸光度を用いても良好な測定結果を得ることができる、したがって、データ処理の基礎となるスペクトルの物理量として吸光度を用いる場合が多い。

4.2.2 平滑化

高い SN 比を必要とする近赤外法では、スペクトルに重量するランダムノイズの低減がスペクトル前処理の重要な目的の 1 つである。このため、普通、多重スキャンにより得られる多数のスペクトルの積算平均が行われる。積算平均処理は、連続スペクトルが得られる分散型分光装置においても、また波長から 10 数波長の離散波長のみを測定するフィルタ型分光装置においても用いられるが、通常はスペクトルの測定プロセスに組み込まれており、データ処理の一部とは認識されていないことが多い。

積算平均処理を行っても充分ノイズを低減しない場合には、さらに平滑化 (smoothing) 処理が行われる。ただし、平滑化が適用できるのは、連続スペクトルの場合だけである。平滑化には、最も一般的な単純移動平均の他に、微分処理も合わせて行える Savitzky-Golay の平滑化がある。

(1) 移動平均

移動平均 (running-average, moving-average) は、各データ点を中心とする数点の近傍のデータの平均値をもって、その点における新しい値とする方法で、

$$A'_i = \sum_{k=-n}^n w_k A_{i+k} \quad (4.4)$$

で表すことができる。ここで、 $A_i = A(\lambda_i)$ ($i=1, 2, \dots$) および $A'_i = A'(\lambda_i)$ はそれぞれ、元の吸光度および処理後の吸光度である。この場合、データ点 i を中心とする $N=2n+1$ 個の吸光度の重み付き平均が計算される。係数 w_k は正規化された重みで、窓関数とも呼ばれる。これが定数、すなわち $w_k=1/N$ である場合は単純移動平均と呼ばれ、演算時間を最小にできることから多用される。スペクトルのサンプリング波長間隔を δ とすると、 N 点の単純移動平均は波長幅 $W=N\delta$ の矩形窓関数による平滑化に相当する。

いま、スペクトルに含まれるランダムノイズがほぼ白色ノイズであって、隣接する波長におけるノイズの間には相関がないものと仮定すると、 N 点にわたる単純移動平均は、ノイズ成分の標準偏差を $1/\sqrt{N}$ に減少させる効果がある。しかし、移動平均は、スペクトル中の信号成分をも同時に平滑化し、スペクトルの波長分解能を低下させるという副作用を伴うことから、 N の値は分光器の波長分解能よりもあまり大きくない範囲で設定しなければならない。

例えば、 $\delta=2\text{nm}$ 、 $n=2$ のとき、ノイズ成分の標準偏差は単純移動平均により $1/\sqrt{5}$ に減少する。一方、これは $W=10\text{nm}$ 幅の窓関数に相当しており、単純移動平均後のスペクトルでは 10nm 以下のスペクトル構造はほぼ消失されることになる。

(2) Savitzky-Golay 法

単純移動平均に伴う信号成分の歪をできるだけ抑えることを目的に、Savitzky と Golay は多項式による最小 2 乗近似を応用した移動平均を提案した²⁰⁾。これは、比較的低次の多項式を窓関数内のデータに適合させ、その残差をノイズとみなすもので、窓関数のデータ点数 N と多項式の次数によって決まる重み係数 w_k を用いて (4.4) 式により計算される。係数 w_k は、用

いる多項式の次数と N の値ごとにあらかじめ数表として求められている。この手法のうち1つの特徴は、微分の次数に対応した数表を用いるだけで、平滑化と同時に微分を行うことができることである。これは、適合させた多項式から微係数が決定できることによる。

Savitzky-Golay 法は、波長分解能の劣化を防ぐのには有効である反面、 N の値に加えて多項式の次数をユーザーが指定する必要がある、最適な平滑化を与える条件が明確でないという問題が指摘されている。

4.2.3 微分

スペクトルの微分処理は、2 波長分光法の考え方を連続スペクトルに拡張したものである。重要なスペクトルデータ処理の1つである。近赤外法では1次および2次の微分スペクトル $dA(\lambda)/d\lambda$, $d^2A(\lambda)/d\lambda^2$ が用いられ、これらは dA , d^2A , または反射スペクトルの場合 $d \log(I/R)$, $d^2 \log(I/R)$ 、透過スペクトルの場合 $d \log(1/T)$, $d^2 \log(1/T)$ と略記されることが多い。

微分スペクトルの特性を理解するには、スペクトルを構成する個々の吸収ピークが微分によってどう変化するかを考えるとよい。図 4.4 の a~c は理想化されたガウス型ピークとその導関数を示したものである。1次微分スペ

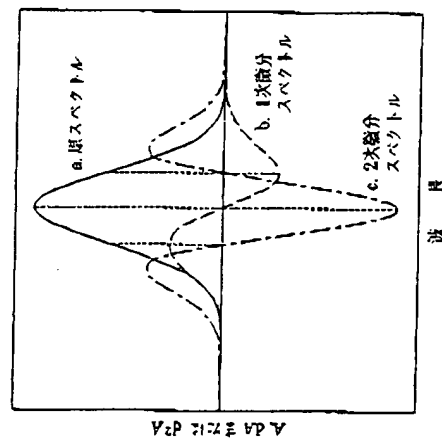


図 4.4 ガウス型ピークとその導関数

4.2 スペクトルの前処理

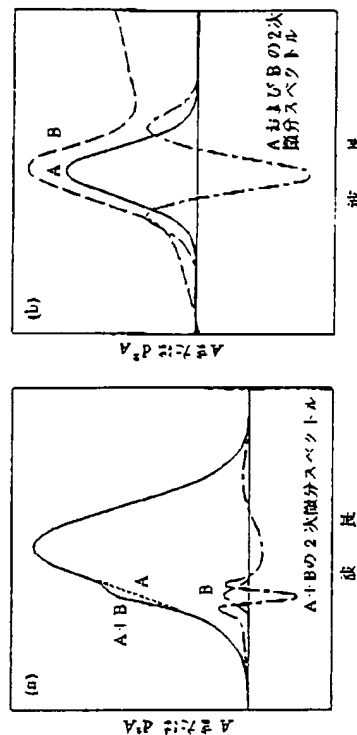


図 4.5 微分スペクトルの効果

クトルでは、原スペクトルのピークがゼロ点となり、原ピークの両側の変曲点が正と負のピークとなって現れる。これに対して、2次微分スペクトルでは、符号が反転するものの、原スペクトルのピークが微分スペクトルのピークに変換され、原スペクトルとの対応が視覚的に把握しやすい。また、微分の次数が高くなるほどピークの幅が狭くなる、高さが同じならば幅の狭いピークの方が微分による強調効果が大いなるなどの特徴もある。

相互に干渉している複数のピークに対しては、互いに近接しているために見掛け上単一に見えるピークを分離する効果、幅の広い大きな吸収に隠れた微小ピークを強調する効果、幅の広いピークの肩に乗ったピークの極大吸収波長を明確にする効果などがある(図 4.5(a))。また、微分スペクトルは、加算的なベースライン変動(加算的散乱因子, 4.2.4項参照)の除去にも効果がある(図 4.5(b))。すなわち、波長に依存しない一定のベースライン変動は、1次微分処理によって完全に取り除かれる。さらに、2次微分処理では、波長の1次関数で表される線形なベースライン変動が除去される。これは、近赤外スペクトルに特有の、水分の吸収に由来する右上がりの傾向変動(トレンド)の補正にも有効である。

これらの特徴を有する微分処理は、スペクトルの構造を解析する際の強力な道具になるうえ、多重共線性のある程度改善し、検量線の性能を著しく向上させることも少なくない。しかし一方で、必要な情報が幅の広い吸収に対

応している場合にはそれを弱めてしまう微小なノイズを強調してしまう、2次微分処理においては副次的な偽のピーク（サイドローブ）を生じさせるなどの欠点も併せもつ。したがって、微分処理を行うかどうかは、状況に応じた判断が必要である。

実際のスペクトルは離散的に測定されており、その微分は次の式を用いて計算される。

$$\Delta A_i = A_{i+1} - A_{i-1} \quad (1 \text{ 次微分}), \quad (4.5)$$

$$d^2 A_i = A_{i+2} - 2A_i + A_{i-2} \quad (2 \text{ 次微分}) \quad (4.6)$$

(4.5) 式は、微分を波長差 $\Delta\lambda = 2k\delta$ の差分で近似したものであり、(4.6) 式は (4.5) 式の操作を2回繰り返した結果である。これらは、一見粗い近似のように見えるが、実は点 i を中心とする3点を通る放物線の点 i の位置における1次および2次の微係数を表す式であって、実用上の精度は充分である。前述のように、微分処理は微小なノイズを強調する作用を併せもつことから、 $\Delta\lambda$ をある程度大きくしてノイズの増大を抑える方法が用いられるが、これには移動平均の場合と同様に微分スペクトルの波長分解能の低下を伴うことに注意しなければならない。通常、 $\Delta\lambda$ と同程度の窓幅 W の移動平均を併用してノイズ低減を図ることが多い。

なお、前述したように、Savitzky-Golay 法も、微分と平滑化を同時に行う処理として用いることができる。

4.2.4 差吸光度と正規化

試料の粒度変動などによる光の散乱状態の変化は、スペクトルにベースライン変動などの大きな影響を及ぼす。これに対処するため、主として重回帰分析を行う際に説明変数に何らかの処置を施すことが多い。これは、スペクトルの前処理という範疇からは少し外れるが、他の前処理法との関連が深いことからここで述べる。

光の散乱状態の変化によってスペクトルに現れる変動としては、加算的なベースライン変動があり、しばしば乗算的な影響も無視できない場合がある。このとき、ある基準となる粒度を持つ試料のスペクトルを $A_0(\lambda)$ とおくと、それとは異なる粒度を持つ試料のスペクトル $A(\lambda)$ は

4.2 スペクトルの前処理

$$A(\lambda) = \alpha A_0(\lambda) + \beta + e(\lambda) \quad (4.7)$$

と表すことができる。ここで、 α は乗算的散乱因子 (multiplicative scatter factor, MSE) と呼ばれ、粒度や表面状態などに依存する係数である。また、 β は加算的ベースライン変動に対応する係数で、ここでは加算的散乱因子と呼ぶことにする。 $e(\lambda)$ は成分の違いによる吸光度の差やランダムノイズを表す項である。

α に比べて β の方が支配的である場合には、前述した微分処理が効果を発揮する。またスペクトル全体を微分する代わりに、目的とする成分の吸収ピークの近傍における比較的近接した2つの波長 λ_1, λ_2 の間の差吸光度 $\Delta A_{12} = A_{12} - A_{21}$ を重回帰分析の説明変数に用いる方法も有効である。これは2波長分光法の考え方に基いている。ところで、 A_i を A_i の近傍の波長とせず、特定の成分の情報を含まない、いわゆる中立波長にとることもある。例えば、砂の中の水分を定植する場合、代表的な水の吸収波長 $1.94 \mu\text{m}$ と、吸収の谷に相当する波長 $1.68 \mu\text{m}$ との差吸光度 $A(1.94) - A(1.68)$ による重回帰式によって含水率を精度良く表すことができる¹⁾。なお、差吸光度としてではなく、説明変数の1つとして中立波長を含めることも近赤外法の重回帰分析においては一般的であり、加算的散乱因子の影響の除去に効果があるが、説明変数の数を少なくするという観点からは、差吸光度を採用することが望ましい。

一方、乗算的散乱因子 α の影響を除去するには、2つの波長 λ_1, λ_2 における吸光度比 A_1/A_2 をとる。 λ_2 には通常中立波長が用いられる。この手法は正規化 (normalization) と呼ばれている。さらに一般的な場合として α と β の2つの因子を考慮に入れるとき、微分スペクトルや差吸光度を正規化した変数、すなわち、

$$\frac{dA_{12}}{dA_2} = \frac{dA(\lambda)/d\lambda|_{\lambda=\lambda_1}}{dA(\lambda)/d\lambda|_{\lambda=\lambda_2}} \quad (4.8)$$

$$\frac{d^2 A_{12}}{d^2 A_2} = \frac{d^2 A(\lambda)/d\lambda^2|_{\lambda=\lambda_1}}{d^2 A(\lambda)/d\lambda^2|_{\lambda=\lambda_2}} \quad (4.9)$$

$$\frac{\Delta A_{12}}{\Delta A_{12}} = \frac{A(\lambda_1) - A(\lambda_2)}{A(\lambda_1) - A(\lambda_2)} \quad (4.10)$$

近赤外分光法入門

1994年9月10日 初版第1刷発行

著者 岩元 睦夫
河野 道夫
魚住 純
発行所 原田 宏

株式会社 幸 園 房
東京都千代田区神田106-1-1
電話 東京 (3292) 3061 (代 表)
Printed in Japan 価格 3000円 00110-6-51894
1994©

00110-6-51894

本書を引用または転載する場合は必ず出所を明記して下さい。
図表等の全部または一部を無断で複製・転写（コピー）することは、
著作権法上の例外を除き、禁じられています。本書からの転写
を希望される場合は、日本複製権センター（03-3401-2382）にこ
連絡ください。

ISBN 4-7621-0127-9 C 3058

Separate sheet 2

Translation of relevant part of
Japanese technical book "Kin-Sekigai Bunseki-Hou
Nyumom" (A Primer for Near-Infrared Spectrometric
Analysis Method)

published on 10th September. 1994

edited by Mutsuo Iwamoto et al

issued from Saiwai Shobo

§ 3.4 Near-Infrared Spectrum

-3.4.1 Determination of Spectrum

Fig. 3.5 (on page 50)

.....typical manners of spectrum determination are
illustrated for permeative (1) and reflexive
techniques (2)....

Fig. 3.6 (on page 51)

.....influence of different ceramic plates (A and
B) as the sample holder on the NIR absorbance spectral
chart of powdered wheat sample is illustrated.....

-3.4.2 Factors having Influence on NIR Spectrum

(1) Particle size (on page 51)

Many physical properties of the sample, such as
the average particle size, particle size distribution,
packing density in the sample cell and so on have
influences on the spectrum by light scattering.
Particle size of cereals, such as wheat etc., may be
influenced by, for example, material quality,

constituent substances and so on, even for samples pulverized under identical conditions. Spectrum shift by particle size for wheat powder is illustrated in Fig. 3.7, in which absorbance shift of NIR spectra for coarse, mildly coarse and fine particle products is shown.

(2) Temperature (on page 52)

Temperature has influence on the absorbance for the O-H bond of water molecule. When temperature is elevated, spectral peak intrinsic to water will be shifted to the side of shorter wave length.

(3) Color of the sample (on page 52)

Since pigments, such as chlorophyll and carotenoid, have intrinsic absorbance band in near-infrared region, samples with colors different from that of the samples for calibration may have problems.

-3.4.3 Near-Infrared Spectrum

Fig. 3.8 illustrates spectral charts for soybean (b) and rice (r) as well as the constituent substances thereof, such as water (w), protein (p), lipid (o) and starch (s). As seen, spectrum peaks for the constituent substances can be seen also for the spectra of soybean and rice. The absorbance band at 1938 nm corresponds to water molecule. The absorbance band at 2100 nm is based on starch which is shown in a more slight intensity for soybean having lower content of starch. The absorbance bands at 2180 nm for protein and at 2305 nm for lipid are clearly indicated for soybean which has higher content of them.

§ 3.5 Analysis Example for Quantitative Analysis

(Multiple Regression Analysis... on page 54)

-3.5.1 Calibration

For performing quantitative analysis of constituent component, such as protein etc., by NIR spectrometry, it is necessary to prepare preliminarily a calibration equation to be used for calculating assessment value from the spectral data. Namely, it is required to explain mathematically the correlation between the assessment value for constituent component and the spectral data using samples for which the content of the constituent component has been analyzed at as high accuracy by conventional chemical analysis. This work is called calibration.

-3.5.2 Evaluation of the Calibration Equation (page 56)

Usually, a plurality of multiple regratation equations are prepared for calibration. For evaluating the observation accuracy for the multiple regression equation prepared, validation or prediction is performed using a set of samples for prediction which are different from the samples for preparing the calibration equation.

§ 4 Technique for Data Processing (page 62)

-4.1.1 Complexity of the Spectrum

On a non-destructive analysis of food or agricultural product by NIR spectrometry, a complexity

of the spectrum is revealed, as contrasted to conventional "destructive spectrometry" using the medium infrared region. In a non-destructive spectrometric analysis, complicate fluctuation will enter in the spectrum due to variation in the elementary factors, such as the physical and chemical properties of the sample and the observation circumstances, in addition to the complexity of the spectrum structure.

(1) Multicollinearity

In general, a spectrum of a sample of a multicomponent system includes overlapped absorbance spectral peaks, so that the spectrum includes at each wave length a plurality of informations in overlapped state. This means that an intensive correlation is present between the wave lengths constituting the ~~spectrum.~~ Such a relation is called multicollinearity.

(2) Non-linearity of Absorbance (on page 63)

In near-infrared spectrometry for non-destructive analysis, so-called diffuse reflectance technique has in many cases been in practical application. Fig. 4.1 illustrates schematically the manner of passage of incidental light through particles of a powdery sample. The light after permeation through the particles will provide absorbance band intrinsic to the substance. In a transmission ray through a non-scattering sample a linear relationship as shown by the so-called Lambert-Beer's Law is present between the concentration of the constituent component and the absorbance. However, for diffuse reflectance

light, such a relationship cannot hold due to the multiscattering phenomenon.

(3) Baseline Deviation and Multiplicative Fluctuation

Also the scattering characteristic of the sample may have influence on the observed spectrum. In particular, powdery sample will be subject to fluctuation in the intensity and direction of the reflected and scattered light as shown in Fig. 4.1. Thus, the resulting spectrum is subjected to additive fluctuations in which the baseline level is fluctuated and to a multiplicative deviation over almost all the spectrum amplitude. Particle size and compact density of powdery samples and surface state and internal structure of solid samples are, in many cases, important factors for causing fluctuation of near-infrared spectrum.

-4.1.2 Flow of Data Processing Operation (on page 64)

It is necessary for picking up necessary informations from near-infrared spectra subject to complicate fluctuations due to the fluctuation factors, to perform a series of data processing by means of a computer. Typical data processing techniques are found installed in computers found in the market as standard software.

For applying NIR spectrometry to qualitative analysis of products, there may usually be incorporated three fundamental steps, namely, (1) calibration, (2) assessment of the accuracy of the calibration equation and (3) analytical work for unknown sample.

(1) Preliminary Treatment of Spectrum (on page 65)

Before the calibration by means of a statistical technique, such as multiple regression analysis or the like, various pretreatments are incorporated usually in order to suppress fluctuations of the spectrum due to the fluctuation factors. Typical pretreatment includes Kubelka-Munk conversion, smoothing, differentiation, normalization and removal of multiplicative scattering factors (MSF).

(2) Calibration (on page 66)

Calibration is a step for constructing a mathematical correlation equation between the spectral data and the analysis values, namely, a model. The construction of the model is performed by means of a statistical technique using the spectral data for the samples for preparing the calibration equation which have been pretreated and the analysis data.

(3) Supplementary Analysis (omitted)

(4) Assessment of Accuracy of the Calibration Equation
(omitted)

(5) Routine Analysis (omitted)

§ 4.2 Preliminary Treatment of Spectrum (on page 67)

-4.2.1 Selection of Physical Quantity of Spectrum

From the Kubelka-Munk's equation

$$K(\lambda)/S(\lambda) = \frac{\{1-R(\lambda)\}^2}{2R(\lambda)}$$

a correlation equation between the ratio of absorption coefficient relative to scattering coefficient and the

absorbance is derived as follows:

$$K(\lambda)/S(\lambda) = \cosh A(\lambda) - 1$$

The relationship between them is clearly non-linear as shown in Fig. 4.3.

-4.2.2 Smoothing

- (1) Running-average, Moving-average (omitted)
- (2) Savitzky-Golay Method (omitted)

-4.2.3 Differentiation (on page 70)

In Figs. 4.4 and 4.5, illustrations of typical Gauss-type spectral peak and the 1st and/or the second order differentiation chart thereof are given.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.